

KONSENTRASI *GONADOTROPIN RELEASING HORMONE* (GnRH) EKSTRAK OTAK SAPI PERANAKAN *FRIESIEN HOLSTEIN* BETINA FASE FOLIKULER DAN LUTEAL

Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) Concentration of Friesien Holstein Crossbreed Cow Brain Extract in Follicular and Luteal Phase

Nurul Isnaini¹ dan Sri Wahjuningsih¹

¹Laboratorium Reproduksi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang
E-mail: roelisy03@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi kandungan *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) ekstrak jaringan otak sapi dewasa pada fase folikuler (ovari berfolikel) dan fase luteal (ovari berkorpus luteum). Pada penelitian ini digunakan 2 buah otak sapi perah peranakan *Friesien Holstein* (FH) dewasa dengan umur 7-8 tahun yang pada saat disembelih kondisi ovarinya menunjukkan fase folikuler (1 buah otak) dan fase luteal (1 buah otak). Analisis kandungan GnRH dilakukan dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) *indirect*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi GnRH bagian otak sapi pada fase folikuler vs fase luteal berturut-turut untuk bagian otak *parietal lobe of cerebral hemisphere*, *corpus callosum*, *thalamus*, *hipothalamus*, *pituitary gland* (hipofise), *midbrain*, *cerebellum*, *pons*, dan *medulla oblongata* masing-masing adalah 260 vs 270, 110 vs 170, 230 vs 320, 1590 vs 1310, 840 vs 1250, 530 vs 810, 200 vs 480, 230 vs 100, dan 220 vs 70 µg/ml. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa semua bagian otak sapi yang diamati mengandung GnRH dengan konsentrasi yang berbeda antara fase folikuler dengan fase luteal.

Kata kunci: konsentrasi GnRH, sapi peranakan FH, fase folikuler, fase luteal

ABSTRACT

This study aims to identify patterns of GnRH content of cow's brain tissue extracts in follicular phase (ovaries with follicles) and luteal phase (ovaries with corpus luteum). This study used 2 brains of Friesien Holstein (FH) crossbreed cows with age ranged between 7-8 years and at the time of slaughtered the conditions of the ovaries were at follicular phase (1 brain) and luteal phase (1 brain). The analysis of GnRH concentration was done using indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that GnRH concentration of each part of the cow's brain in follicular phase vs luteal phase in succession were: parietal lobe of cerebral hemisphere, corpus callosum, thalamus, hypothalamus, pituitary gland (hipofise), midbrain, cerebellum, pons, and medulla oblongata were 260 vs 270, 110 vs 170, 230 vs 320, 1590 vs 1310, 840 vs 1250, 530 vs 810, 200 vs 480, 230 vs 100, and 220 vs 70 µg/mL. It can be concluded that all parts of the brain observed contain GnRH which different in concentration between follicular phase and luteal phase.

Key words: concentrations of GnRH, FH crossbreed cow, follicular phase, luteal phase

PENDAHULUAN

Dalam siklus berahi sapi terdapat perubahan-perubahan fisiologis yang terjadi. Salah satu perubahan fisiologis terjadi pada ovarium yaitu perkembangan pada ovarium yang terbagi menjadi beberapa fase. Secara singkat, fase perkembangan ovarium dibagi menjadi dua yaitu fase folikuler dan fase luteal. Pada masing-masing fase tersebut terdapat perubahan hormon yang memengaruhi siklus berahi (Hafez, 2008).

Otak sapi merupakan penghasil *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) yang salah satunya berfungsi sebagai pengatur aktivitas adenohipofisa dalam menstimulasi pelepasan *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH). Stimulasi pelepasan FSH dan LH menyebabkan folikel pada ovarium tumbuh, mensekresikan hormon estrogen yang mengatur tingkah laku berahi dan akhirnya ovulasi di bawah pengaruh LH. Dalam siklus reproduksi, estrogen memiliki umpan balik positif terhadap sekresi FSH dan LH oleh adenohipofisa. Dalam hal ini GnRH beraksi sebagai *neurotransmitter* dan *neuromodulator* pada sistem saraf pusat dan akan beraksi pada *pituitary gonadotrope*. Peningkatan level

GnRH akan mengakibatkan peningkatan level LH. Hormon GnRH memengaruhi secara positif tingkah laku seksual dan terjadinya berahi pada sapi. Hormon-hormon steroid ovarium memengaruhi sistem saraf pusat untuk melepaskan GnRH. Konsentrasi estradiol yang rendah dan progesteron tinggi akan menurunkan pelepasan GnRH oleh hipotalamus. Dalam literatur sangat sedikit informasi yang membahas tentang kandungan GnRH pada sapi.

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi pola kandungan GnRH ekstrak jaringan otak sapi pada fase folikuler dan luteal. Diharapkan penelitian ini bisa dimanfaatkan sebagai bahan induksi estrus sapi peranakan FH yang mengalami anestrus pascapartum.

MATERI DAN METODE

Pengambilan sampel jaringan otak sapi dilakukan di Rumah Potong Hewan (RPH) Singosari Malang sedangkan pelaksanaan ekstraksi jaringan otak sapi dan analisis kandungan GnRH dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) *indirect* dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas

Brawijaya, Malang. Materi penelitian yang digunakan adalah ekstrak jaringan otak sapi perah betina pada fase folikuler dan fase luteal.

Koleksi jaringan otak sapi dilakukan di RPH Singosari Malang. Identifikasi kondisi untuk menentukan sampel penelitian dilakukan dengan cara melihat jenis kelamin sapi dan melihat kondisi ovarium (berfolikel atau berkorpus luteum). Masing-masing 1 buah jaringan otak sapi yang dikoleksi segera setelah sapi perah dengan kondisi ovarium berfolikel dan ovarium berkorpus luteum dipotong, kemudian jaringan yang didapatkan dicuci dengan air bersih, disimpan dalam kotak *stereofom* yang telah diberi es dan segera dibawa ke laboratorium untuk dilakukan isolasi bagian-bagian otak yang diperlukan (*parietal lobe of cerebral hemisphere, corpus callosum, thalamus, hypothalamus, pituitary gland* (hipofisa), *midbrain, cerebellum, pons*, dan *medulla oblongata*) dengan bantuan atlas otak sapi, dan ditambahkan *phosphate buffer saline* (PBS).

Ekstraksi jaringan otak sapi dilakukan dengan menimbang masing-masing 1 g jaringan otak sapi, yang kemudian digerus dengan menggunakan mortar dingin dan pasir kuarsa. Hasil gerusan sampel yang telah halus ditambahkan bufer ekstrak glutamat dekarboksilase (GAD) sebanyak 5 kali volume dan dimasukkan ke dalam tabung polipropilen yang selanjutnya diaduk dengan *vortex* selama 10 menit. Dilanjutkan dengan sonikasi selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam eppendorf dan disimpan pada suhu -20° C untuk diukur konsentrasi GnRHnya.

Antigen (supernatan hasil ekstraksi) dengan kadar 1 µg/ml dilarutkan dalam bufer karbonat bikarbonat (*coating buffer*) 100 µl tiap sumuran, selanjutnya diinkubasi pada suhu 4° C selama satu malam. Kemudian *microplate* dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) tween-20 sebanyak 3x3 menit tiap sumuran, setelah itu *blocking buffer* dimasukkan pada *microplate* sebanyak 100 µl tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. *Microplate* dicuci kembali dengan PBS tween-20 sebanyak 3x3 menit. Antibodi primer (anti-GnRH II) dilarutkan dalam *blocking buffer* BSA 1% dengan seri pengenceran yaitu 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, dan 1/800 kemudian dimasukkan dalam *microplate* masing-masing 100 µl tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. *Microplate* dicuci dengan PBS tween-20 sebanyak 3x3 menit. Selanjutnya diinkubasi dengan antibodi sekunder IgG biotin dilarutkan dalam PBS tween-20 dengan perbandingan 1:1000 selama 1 jam pada suhu ruang. *Microplate* dicuci dengan PBS tween-20 sebanyak 3x3 menit. Kemudian diinkubasi dengan *streptavidin horseradish peroxidase* (SA-HRP) dengan perbandingan 1:1000 selama 1 jam pada suhu ruang. *Microplate* dicuci dengan PBS tween-20 sebanyak 3x3 menit. Kemudian dimasukkan *sure blue* TMB sebanyak 100 µl tiap sumuran dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, selanjutnya ditambahkan HCl 1 N (*stopping reaction*) sebanyak 100 µl tiap sumuran dan

diinkubasi selama 15 menit. Setelah itu diukur titer menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 450 nm. Konsentrasi GnRH diketahui dengan persamaan regresi $Y = aX + b$ (Aulani'am, 2005). Data hasil pengukuran kadar GnRH yang didapatkan dianalisis menggunakan analisis deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hormon GnRH memiliki fungsi sebagai pengatur aktivitas adenohipofisa dalam menstimulasi pelepasan FSH dan LH. Pada penelitian ini pengukuran konsentrasi GnRH dilakukan dengan metode ELISA menggunakan standar *bovine* GnRH. Hasil pengukuran konsentrasi pada sapi peranakan FH pada fase berbeda disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi GnRH ekstrak otak sapi peranakan FH pada fase berbeda (µg/ml)

Bagian otak ke	Betina ovarium berfolikel	Betina ovarium berkorpus luteum
1	260	270
2	110	170
3	230	320
4	1.590	1.310
5	840	1250
6	530	810
7	200	480
8	230	100
9	220	70

1= *parietal lobe of cerebral hemisphere*; 2= *corpus callosum*; 3= *thalamus*; 4= *hypothalamus*; 5= *pituitary gland* (hipofise); 6= *midbrain*; 7= *cerebellum*; 8= *pons*; dan 9= *medulla oblongata*

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa semua bagian otak sapi yang diamati mengandung GnRH dan kandungan GnRH ekstrak otak sapi pada fase berbeda (betina ovarium berfolikel dan betina ovarium berkorpus luteum) adalah berbeda. Kandungan GnRH tertinggi adalah pada bagian hipotalamus. Hipotalamus yang diperoleh dari sapi dengan ovarium berfolikel memiliki kandungan GnRH lebih tinggi (1.590 µg/ml) jika dibandingkan dengan betina ovarium berkorpus luteum (1.310 µg/ml). Sehubungan dengan hal ini Moss dan Nett (1980) menyatakan bahwa kandungan GnRH pada berbagai hewan domestik maupun hewan percobaan sangat dipengaruhi oleh jenis kelamin dan status siklus estrus dari hewan yang bersangkutan. Du *et al.* (2005) menyatakan dengan menggunakan *radioimmunoassay* (RIA) dilaporkan bahwa konsentrasi GnRH pada jaringan otak ikan sangat dipengaruhi oleh musim. Pola GnRH pada sapi proestrus dan awal fase luteal lebih tinggi jika dibandingkan dengan pada pertengahan fase luteal. Proporsi GnRH selama pertengahan fase luteal menurun antara 23-25% dan secara signifikan lebih rendah daripada selama awal fase luteal.

Pada saat preovulatori, konsentrasi GnRH meningkat. Dalam hal ini GnRH beraksi sebagai neurotransmitter dan neuromodulator pada sistem saraf pusat dan ini akan beraksi pada pituitari gonadotrop. Tingginya GnRH akan berakibat dengan tingginya LH. Hormon GnRH memengaruhi secara positif terhadap

tingkah laku seksual dan terjadinya berahi pada sapi dan kuda (Mc Donnel *et al.*, 1989). Hormon-hormon steroid ovarium memengaruhi sistem saraf pusat untuk melepas GnRH. Konsentrasi estradiol yang rendah dan progesteron tinggi akan menurunkan pelepasan GnRH oleh hipotalamus. Konsentrasi GnRH tinggi pada fase proestrus dan awal fase luteal pada sapi dara (82-85%) dan kera resus (79-87%) (Van Vugt *et al.*, 1985; Skinner *et al.*, 1995; Skinner *et al.*, 1997; Gazal *et al.*, 1998). Pada pertengahan fase luteal GnRH sapi dara menjadi 60%. Progesteron menurunkan jumlah reseptor GnRH pada pituitari mengatur mRNA pengode reseptor untuk GnRH (Bauer-Danton *et al.*, 1995).

Dari Tabel 1 juga dapat dilihat bahwa hipotalamus pada sapi dengan ovarium berkorpus luteum memiliki kandungan GnRH lebih rendah dibandingkan dengan kandungan GnRH betina dengan ovarium berfolikel. Hal ini disebabkan korpus luteum merupakan sekretor utama progesteron, dan dengan sifat dan aktivitasnya dalam kegiatan reproduksi hormonal, progesteron memiliki kemampuan untuk memberikan *feedback* negatif kepada hipotalamus sehingga sekresi GnRH menjadi rendah (Hafez, 2008).

KESIMPULAN

Semua bagian jaringan otak sapi yang diamati mengandung GnRH tetapi konsentrasinya berbeda pada fase yang berbeda (betina ovarium berfolikel dan betina ovarium berkorpus luteum). Bagian hipotalamus menghasilkan kadar GnRH tertinggi, masing-masing untuk betina ovarium berfolikel dan betina ovarium berkorpus luteum adalah 1.590 dan 1.310 µg/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Aulani'am. 2005. **Protein dan Analisanya**. Citra Mentari Group. Malang.
- Bauer-Danton, A.C., J. Weiss, and J.L. Jameson. 1995. Roles of estrogen, progesterone and GnRH in the control of pituitary GnRH. Receptor gene expression at the time of the preovulatory gonadotropin surges. **J. Endocrinol.** 136:1014-1019.
- Du, J.L., Y.H. Lee, W.S. Yueh and C.F. Chang. 2005. Seasonal profiles of brain and pituitary gonadotropin-releasing hormone and plasma luteinizing hormone in relation to sex change of protandrous Black Porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. **J. Biol. Reprod.** 72:922-931.
- Gazal, O.S., L.S. Leshin, R.L. Stanko, M.G. Thomas, D.H. Keisler, L.L. Anderson, and G.L. Williams. 1998. GnRH secretion into third ventricle cerebrospinal fluid of cattle correspondence with the tonic and surge release of luteinizing hormone and its tonic inhibition by suckling and neuropeptide. **J. Biol. Reprod.** 59:676-683.
- Hafez, E.S.E. 2008. **Reproduction in Domestic Animals**. Lea and Febiger, Philadelphia.
- McDonnell, S.M., N.K. Dile, M.C. Garcia, and R.M. Kenney. 1989. GnRH effect precopulatory behavior in testosterone-treated geldings. **J. Physiol.** 45:145-149.
- Moss, G.E. and T.M. Nett. 1980. GnRH interaction with anterior pituitary. IV. Effect of estradiol 17β on GnRH-mediated release of LH from ovine pituitary cells obtained during the breeding season, anestrus season and period of transition into or out of the breeding season. **J. Biol. Reprod.** 23:298-403.
- Skinner, D.C., B. Malpoux, B. Delaleu, and A. Caraty. 1995. LH-RH in third ventricular cerebrospinal fluid of the ewe, correlation with LH pulses and the LH surge. **J. Endocrinol.** 136:3230-3237.
- Skinner, D.C., A. Caraty, B. Malpoux, and N.P. Evans. 1997. Simultaneous measurement of GnRH in the third ventricular cerebrospinal fluid and hypophyseal portal blood of the ewe. **J. Endocrinol.** 138:4699-4704.
- Van Vugt, D.A., W.D. Diefenbach, E. Alston, and M. Ferin. 1985. GnRH in third ventricular cerebrospinal fluid of ovariectomized rhesus monkeys: Correlation with LH pulses. **J. Endocrinol.** 117:1550-1558.